37-41 E875(8)

动 物 学 研 究 1995, 16 (1): 37—41 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

肌肽对绵羊精子无氧酵解的影响*

谭竹钧 靳雅莉
(内蒙古大学 呼和浩特 010021) (内蒙古农牧学院)

S826.1

A

摘要 在无氧条件下，绵羊精子通过酵解途径获得能量，代谢结果产生大量乳酸，本实验通过测定精子悬液中果糖摄取以及乳酸生成量，研究肌肽、棉酚对绵羊精子酵解途径的影响。结果表明：4 mM 肌肽对绵羊精子酵解有显著增强作用，并能刺激精子对果糖的摄取。12 μM 棉酚对绵羊精子无明显抑制；棉酚能部分抑制肌肽对精子的酵解作用。

关键词 绵羊精子，肌肽，棉酚，果糖摄取，酵解

Salisbury(1961)在研究公牛精液性质时就发现洗涤过的精子不能在不含糖的培养液中长期存活，只有添加果糖才能延长其存活时间。事实上，许多哺乳动物包括灵长类的精子主要依赖于精液中的果糖、葡萄糖、山梨醇等碳水化合物的降解提供能量，维持精子的运动。精子运动和果糖酵解呈正相关(Bishop，1954)，家畜附睾精子运动性低，果糖酵解速率也低；而射出精子活动力强，果糖酵解也很强(Voglmayr 等，1967)。Hoskins(1973)用咖啡因、茶碱、cAMP、双丁酰 cAMP，分别与牛精子共同孵育，果糖酵解速率增大 3 至 5 倍，精子运动增强，如将磷酸化过程和环化核苷酸加以抑制，酵解过程亦将受到阻碍，活力也随之下降。在我们以前的研究中(方天祺等，1987)，肌肽可显著提高绵羊精子活力，并延长其存活时间。深入研究发现肌肽促进绵羊精子呼吸强度增强、膜无机磷转运加强，并刺激线粒体氧化磷酸化产生大量 ATP。Qureshi 等(1962)也曾报告肌肽强烈刺激肌肉细胞酵解作用。这些研究表明肌肽是一种与细胞能量代谢有关的生物活性物质。

棉酚抗精子作用，在国内外已有较为详尽研究，它不仅对精子质膜、线粒体以及运动系统造成损伤，而且对精子代谢、酶活性变化等均有影响。棉酚作为精子氧化磷酸化作用解耦联剂业已证实(Abou-Donia 等，1974)。并对猪、恒河猴、大鼠等多种动物精子酵解均有强烈的抑制效应(Stephens 等，1983；Wichmann 等，1983)。本文通过肌肽、棉酚分别与绵羊洗涤精子共同孵育，探讨二者对绵羊精子酵解的作用，以及对精子代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 精液的采集和处理

用人工采精常规方法收集 2—3 只种公羊(高加索细毛羊，畜龄 2—4 岁，健壮)精液，混匀，按 1∶5 倍体积加入精子洗涤液(40 mM KCl，102 mM NaCl，5 mM $MgSO_4$·

* 内蒙古自治区自然科学基金资助项目

本文 1994 年 6 月 1 日收到，同年 8 月 15 日修回

7 H_2O, 10 mM KH_2PO_4, 20 mM Tris 0.5 mg / ml 链霉素, 500 U / ml 青霉素 pH7.4)洗2次, 800 r / min 离心 5 min, 弃去上清, 用原精液 2 倍体积精子培养液(40 mM KCl, 82 mM NaCl, 5 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mM KH_2PO_4, 20 mM Tris, 10 mM α-酮戊二酸, 0.8%果糖, 0.4%BSA, 0.5 mg / ml 链霉素, 500 U / ml 青霉素 pH 7.4)洗涤 1 次, 800 r / min 离心 5 min, 弃去上清, 用培养液稀释成 10^9 精子 / ml 悬浮液。

1.1.1 精子质量评定 采用平板压片法, 34℃恒温, 400 倍光镜下观察精子活力, 按百分制评定精子质量。

1.1.2 精子存活率测定 采用伊红-苯胺黑死活染色法, 每个样品精子涂片 2 张, 每张统计 500 个精子, 按百分比计算活精子数。

1.2 实验方法

取精子悬浮液, 分组, 分别加入肌肽、棉酚以及肌肽棉酚混合液, 使反应总体积为 1.0 ml。其中精子最终浓度为 1×10^8 精子 / ml, 肌肽最终浓度为 4 mM / ml; 棉酚为 12 μM / ml; 混合处理组为 4 mM / ml 肌肽+12 μM / ml 棉酚。加样完毕摇匀, 充入 N_2 排尽空气, 用封口塑料膜封口, 同时置入 37℃恒温水浴。30 min 后立即用 0.5 ml 冰冷的 15%三氯醋酸终止反应, 1500 r / min 离心 10 min, 弃去沉淀, 上清液测定剩余果糖和乳酸。

1.2.1 果糖测定 采用蔡武城等(1982)的方法, 测定各处理组剩余果糖, 按精子存活率折算果糖摄取量, 同时测定空白培养液计算果糖回收率。

1.2.2 乳酸测定 按张龙翔等(1982)的方法, 测定各组精子乳酸生成量。

1.3 试剂

肌肽 Sigma 公司产品, 用精子培养液配制, 棉酚为中国医学科学院药物研究所提供。水溶性棉酚按柯一保(1981)法配制。其他试剂均为分析纯。

2 结果与讨论

2.1 肌肽、棉酚对洗涤绵羊精子存活率的影响

绵羊精子经过洗涤呼吸及活力下降, 这是由于部分精子在洗涤时受到机械损伤, 另外在洗涤过程中, 线粒体呼吸链中的细胞色素 C 渗漏出细胞, 影响了产能(Mann, 1964)。用伊红-苯胺黑染色, 这部分精子虽然失去运动, 但并不死亡, 仍可进行代谢活动。肌肽、棉酚及混合处理精子在恒温水浴中 30 min 后, 各组存活率和孵育初相比无显著差异, 棉酚处理精子存活率略有下降, 经方差分析未达到显著差异(表 1)。

表 1 肌肽棉酚对绵羊洗涤精子存活率的影响

Tab. 1 The effects of carnosine and gossypol on survival rate of washed ram spermatozoa

孵育时间(min)	0		30	
	存活率(%)	活力(%)	存活率(%)	活力(%)
对照	75.38 ± 13.18	70	77.94 ± 11.96	70
肌肽 4 mM	79.95 ± 15.27	70	76.85 ± 12.74	75
棉酚 12 μM	74.62 ± 13.63	70	68.07 ± 13.91	60
肌肽+棉酚 4 mM+12 μM	84.29 ± 11.82	80	80.03 ± 18.33	75

2.2 肌肽、棉酚对绵羊精子果糖摄取的影响

射出精子 ATP 的含量和精子的活力完全依赖果糖正常代谢的稳定(Mann、1964)。精子是特化的细胞，本身含极少胞质，因而质膜上有相应发达的糖转运系统以及无机磷酸盐转运系统，这些转运系统常常受钙调蛋白、Mg^{++}、Ca^{++} 离子、cAMP 等物质的生物调节(方天祺等，1987)。肌肽处理绵羊精子时，无论在有氧或无氧条件下都能刺激精子摄取果糖。棉酚的作用，使精子对果糖摄取量稍有减少，经方差分析，差异不显著（表 2)。棉酚可部分抵消肌肽的作用。这是由于棉酚易与蛋白质或肽类结合(Kevin 等，1984)。肌肽是一个二肽，分子上有游离的$-NH_3^+$和$-COO^-$基，能与棉酚分子上的-OH 基、-CHO 基非共价结合，从而削弱了肌肽的作用。

表 2　肌肽棉酚对绵羊精子果糖摄取的影响

Tab. 2　The effects of carnosine and gossypol on fructose uptake by ram spermatozoa

果糖摄取量(mg／10⁸ 精子)	有 O_2		无 O_2	
	$\bar{X}\pm S$	%	$\bar{X}\pm S$	%
对照	496.67 ± 60.27	100	446.67 ± 80.82	100
肌肽　4 mM	673.30 ± 30.55**	136	613.30 ± 46.18**	138
棉酚　12 μM	448.67 ± 52.20	90	399.33 ± 36.50	89
肌肽+棉酚 (4 mM+12 mM)	586.63 ± 25.28**	118	509.20 ± 33.84*	114

$n=6$　　** $p<0.001$　　* $p<0.005$ (与对照)

2.3 肌肽、棉酚对绵羊精子果糖酵解的影响

果糖或葡萄糖作为能源被氧化，必然进入糖代谢过程中，经过一系列酶促反应，生成丙酮酸。在有氧条件下，丙酮酸在丙酮酸脱氢酶系的催化下生成乙酰辅酶 A 进入 Krebs 循环；无氧时则被还原成乳酸积累下来，肌肽在无氧时可强烈刺激酵解作用加强，产生大量的乳酸，增量高出对照 80%。12 μM 棉酚对绵羊精子果糖酵解无抑制作用(表 3)。Wichmann 等(1983)用^{14}C 标记的糖和丙酮酸与人精子共同孵育，然后测定^{14}C 乳酸和 CO_2，其结果表明当棉酚达 50 μM／10^8 精子浓度时，乳酸和 CO_2 产生受到强烈的抑制，而 Stephens(1983)用 8 nm／10^8 精子棉酚浓度才抑制恒河猴精子酵解的 50%。可见各种动物精子酵解对棉酚的感受程度有差别。我们用 12 μm／10^8 精子棉酚未能达到有效抑制绵羊精子酵解的浓度。

表 3　肌肽棉酚对绵羊精子酵解的影响

Tab. 3　The effects of carnosine and gossypol on glycolysis of ram spermatozoa

乳酸生成量(μg／10⁸ 精子)	有 O_2		无 O_2	
	$\bar{X}\pm S$	%	$\bar{X}\pm S$	%
对照	52.32 ± 17.21	100	70.89 ± 25.97	100
肌肽　4 mM	88.53 ± 37.28*	138	127.88 ± 36.84**	180
棉酚　12 μM	51.17 ± 23.84	100	70.58 ± 31.99	99
肌肽+棉酚　4 mM+12 μM	78.25 ± 22.67	127	100.69 ± 54.20*	142

$n=6$　　** $P<0.001$　　* $P<0.005$ (与对照)

精子果糖摄取和降解要经过一系列复杂的生物化学代谢过程，涉及到多种酶类、激素等诸多因素的参与和调控。Hoskins(1973)认为最主要是由己糖激酶、磷酸果糖激酶以及

丙酮酸激酶起调控作用。另外 3-磷酸甘油醛脱氢酶、磷酸甘油酸激酶也起重要作用(Hoskin, 1973)，用咖啡因、茶碱等化合物处理牛精子，证实这些物质是在 3-磷酸甘油醛脱氢酶水平上刺激糖酵解。肌肽促进绵羊精子酵解加强，是否在 3-磷酸甘油醛脱氢酶水平上调节酵解作用。仍无过多证据。但方天祺等(1987)的研究实验中，绵羊精子在内源性 ATP 消耗尽时，活力下降，补加外源性 ATP 能恢复运动和活力，代之肌肽能恢复活力，如果再加入适量 cAMP，则精子活力显著提高。这提示肌肽有可能通过磷酸化和环核苷酸水平上刺激酵解作用。肌肽促进绵羊精子膜无机磷酸盐转运载体转运无机磷进入胞质，并在 ATP 供能情况下与膜上专一性蛋白结合激活腺苷酸，环化酶，催化 ATP 生成 cAMP、由 cAMP 激活蛋白激酶，后者再激活磷酸化酶。具有活性的磷酸化酶在 ATP 供能的情况下可催化果糖磷酸化而进入糖酵解途径。

参 考 文 献

方天祺，谭竹钧，1987. 肌肽对绵羊精子活力及能量代谢的作用. 内蒙古大学学报，**18**(4)：837—842.

方天祺、刘中大，1987 肌肽对绵羊去膜精子和深冻精子复活作用的研究. 内蒙古大学学报、**18**(4)：843—850.

张龙翔等，1982. 生物化学实验方法和技术. 北京：高等教育出版社，281—288.

柯一保，1981. 水溶性棉酚制剂制备. 生殖与避孕、**2**：58

蔡武城、袁厚积，1982 生物物质常用化学分析法. 北京：科学出版社，14.

Abou-Donia M B *et al*, 1974. Gossypol: uncoupling of respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Life Sci.*, **14**: 1955-1963.

Bishop M W H, 1954. Semen characteristics and fertility in the bull. *The Journal of Agricultural Science*, **44**: 227-248.

Hoskin D D, 1973. Adenine nucleotide mediation of fructolysis and motility in bovine epididymal-spermatozoa. *J. Biol Chem.*, **25**: 1135-1140.

Kevin J, Whaley D S, 1984. A circular dichroism study of (+) gessypol binding to protein. *Biochem. Biophys Resea. Commun.*, **121**(3): 953-959.

Mann T, 1964. The biochemstry of semen and of the reproductive tract. London: Printed in Great Britain, 265-307.

Qureshi Y, Wood T, 1962. The effect of carnosine on glycolysis and motility of monkey spermatozoa *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, **69**: 447-452.

Salisbury G W *et al*, 1961. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. W. H. Freeman and Company. 373.

Voglmayr J K *et al*, 1967. Metabolism of testicular spermatozoa and characteristics of testicular fluid collected from conscious rams. *J. Reprod Fert.*, **14**: 87-99.

Wichmann K *et al*, 1983. Effect of gossypol on the motility and metabolism of hunan spermatozoa *J Reprod. Fert.*, **69**: 259-264.

THE EFFECTS OF CARNOSINE ON GLYCOLYSIS OF RAM SPERMATOZOA

Tan Zhujun

(Inner Mongolia University, Huhhot 010021)

Han Yali

(Inner Mongolia Institute of Agriculture and Animal Husbandry)

Abstract

Ram spermatozoa obtained energy from glycolysis and a vast amount of lactic acid was produced under the non-oxygen condition. In this paper, We studied the effects of carnosine and gossypol on the glycolytic pathway of the ram spermatozoa by examing the quantity of absorbed fructose and produced lactic acid in the sperm. The results indicated that:

(1) Carnosine (4 mM) significantly increased the glycolysis of ram spermatozoa and stimulated them to absorb the fructose.

(2) Gossypol (12 μM) had no inhibitory action on glycolysis of the ram spermatozoa, but could partly reduce the effects of carnosine on the glycolysis of them.

Key words Ram spermatozoa, Carnosine, Gossypol, Fructose absorption, Glycolysis